

PRIMENA EKSPERIMENTALNOG DIZAJNA U  
OPTIMIZACIJI VIS SPEKTROFOTOMETRIJSKE  
METODE ZA ODREĐIVANJE FEROGLICIN SULFATA  
U *ORFERON RETARD*<sup>®</sup> TABLETAMA

MIRA ZEČEVIĆ, BILJANA JOCIĆ, IVANA IVANOVIĆ

*Institut za farmaceutsku hemiju i analitiku lekova, Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450,  
11000 Beograd, E-mail: mzecevic @pharmacy.bg.ac.yu*

**APSTRAKT**

Preparati gvožđa su namenjeni za oralnu upotrebu u obliku tableta, kapsula, suspenzija i vina kao i za parenteralnu upotrebu u obliku injekcija. U ovom radu ispitivane su *Orferon retard*<sup>®</sup> tablete koje sadrže feroglicin sulfat. Sadržaj gvožđa u njima je određivan primenom VIS spektrofotometrijske metode. Eksperimentalni dizajn je korišćen u cilju definisanja optimalnih eksperimentalnih uslova. Uobičajeni način optimizacije ispitivanjem jednog po jednog faktora je neracionalan i sadrži veliki broj nepotrebnih eksperimenata, a takođe ne razmatra uticaje interakcija između faktora. Primenom 2<sup>3</sup> faktorskog dizajna po određenom matematičko-statističkom modelu pripremljena je serija planiranih eksperimenata i ispitan je uticaj svih značajnih faktora pri čemu je omogućeno da se neki faktori menjaju u isto vreme. Na taj način je omogućeno postavljanje pretpostavki o eksperimentalnim optimumima, čime se mogu poboljšati osetljivost, selektivnost i specifičnost metode (1).

**Ključne reči:** feroglicin sulfat, VIS spektrofotometrija, eksperimentalni dizajn, optimizacija

## UVOD

Preparati gvožđa se koriste u terapiji ili profilaksi sideropenične anemije koja nastaje usled nedostatka gvožđa u organizmu što može nastati kao posledica hroničnih krvarenja, u toku graviditeta, u toku perioda brzog rasta kod dece i adolescenata, zbog poremećaja resorpcije u GIT-u, kod prevremeno rođene dece itd. (2). Preparati gvožđa se primenjuju oralno i parenteralno i to najčešće u obliku gvožđe(II) soli koje se najbolje apsorbuju. Feroglicin sulfat je helat gvožđe(II) sulfata i glicina koji ima istu aktivnost i upotrebu kao i soli gvožđa. Prednost mu je bolja GIT podnošljivost zbog organski vezanog gvožđa u preparatu (3).

Oficinalne metode za određivanje gvožđa koje propisuje većina svetskih farmakopeja zasnivaju se na oksidoredukcionim osobinama gvožđa i određivanje se vrši titracijom sa Ce(IV) solima. Joni gvožđa se mogu odrediti i stvaranjem obojenih helatnih kompleksa sastava 1:1 sa različitim ligandima (4). U ovom radu za određivanje feroglicin sulfata u *Orferon retard®* tabletama primenjena je VIS spektrofotometrijska metoda koja se zasniva na reakciji građenja kompleksa između gvožđe(II) jona i 2,2'-dipiridina.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### Reagensi i aparati

U toku rada korišćen je reagens rastvor 2,2'-dipiridina, Merck, Darmstadt, Germany, 10% rastvor hidroksilamin hidrohlorida, Belor, Novi Beograd i 30% rastvor amonijum acetata, Lachema, Czech Republic.

Odmeravanja supstanci su vršena na elektronskoj analitičkoj vagi 121 S Sartorius, Germany, merenja apsorbanije na spektrofotometru Spekol 11, Karl Zeiss Jena, Germany a rastvaranje supstanci u ultrazvučnom kupatilu Fungi lab S. A.

### Standardna supstanca i farmaceutski dozirani oblik

Standardna supstanca je feroglicin sulfat, Pliva, Zagreb, Hrvatska, a dozirani oblik *Orferon retard®* tablete ( sadržaj jedne tablete je 100mg  $\text{Fe}^{2+}$  u obliku feroglicin sulfata ), Pliva, Zagreb, Hrvatska.

### **Priprema standardnog rastvora ferglicin sulfata**

Odmeriti tačno 55mg standardne supstance ferglicin sulfata, preneti u odmerni sud od 50ml, rastvoriti dodatkom 0.2% rastvora HCl i dopuniti do oznake. U odmerni sud od 50ml otpipetirati 5ml ovog rastvora i dopuniti do oznake istim rastvorom HCl. Koncentracija rastvora  $\text{Fe}^{2+}$  je 20 $\mu\text{g/ml}$ .

### **Priprema rastvora za kalibracionu krivu**

U odmerne sudove od 10ml otpipetirati redom po 0.10ml, 0.50ml, 1.00ml, 1.50ml i 2.00ml standardnog rastvora, dodati 3 ml 10% rastvora hidroksilamin hidrohlorida i ostaviti da stoji 5 minuta. Svakom rastvoru dodati 3 ml 30% rastvora amonijum acetata i 1ml reagensa 2,2'-dipiridina, dopuniti do crte sa 0.2% rastvorom HCl i ostaviti da stoji 1 sat. Dobijeni rastvori su koncentracija 0.2 $\mu\text{g/ml}$ , 1.0 $\mu\text{g/ml}$ , 2.0 $\mu\text{g/ml}$ , 3.0 $\mu\text{g/ml}$  i 4.0 $\mu\text{g/ml}$ .

### ***Priprema rastvora standardne supstance za procenu preciznosti***

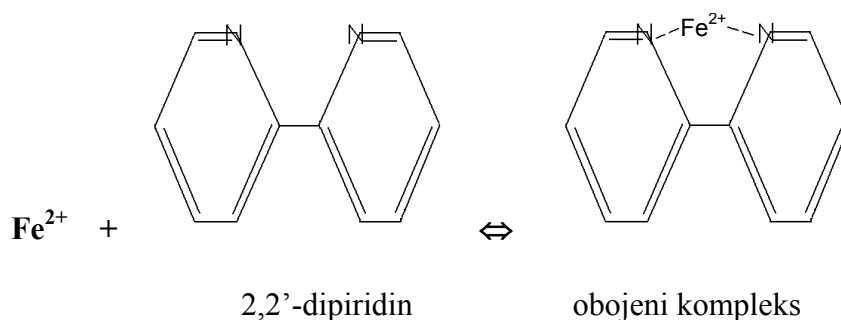
Kako je opisano pod «**Priprema rastvora za kalibracionu krivu**» pripremiti po 7 standardnih rastvora za koncentracije standarda 1.0 $\mu\text{g/ml}$ , 2.0 $\mu\text{g/ml}$  i 3.0 $\mu\text{g/ml}$ .

### ***Priprema rastvora analize***

Odmeriti onu količinu sprašene tabletne mase koja sadrži 55mg ferglicin sulfata, preneti u odmerni sud od 50ml, dodati 0.2% rastvor HCl i 10 minuta rastvarati u ultrazvučnom kupatilu. Odmerni sud dopuniti do crte istim rastvaračem i filtrirati. U odmerni sud od 50ml preneti 5,00ml ovog rastvora i dopuniti do crte istim rastvorom HCl. U odmerni sud od 10ml preneti 1,00 ml ovog rastvora i dopuniti istim rastvorom HCl do crte. Koncentracija ovako dobijenog rastvora je 2.0 $\mu\text{g/ml}$   $\text{Fe}^{2+}$ . U odmerni sud od 10ml otpipetirati 1,00 ml ovog rastvora, dodati 3 ml 10% rastvora hidroksilamin hidrohlorida, ostaviti da stoji 5 minuta, dodati 3 ml 30% rastvora amonijum acetata, 1 ml reagensa 2,2'-dipiridina, dopuniti do crte sa 0.2% rastvorom HCl i ostaviti da stoji 1 sat. Pripremiti 10 ovakvih rastvora. Meriti apsorbanciju rastvora na 520nm.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Feroglicin sulfat je helat gvožđe(II) sulfata i glicina,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2 \cdot \text{FeSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  u feroglicin sulfatu može da se odredi primenom VIS spektrofotometrijske metode u obliku kompleksa sa 2,2'-dipiridinom što je predstavljeno reakcijom:



Primenom faktorskog dizajna ispitani su optimalni eksperimentalni uslovi građenja kompleksa. Ispitivani su uticaji koncentracija tri korišćena reagensa kao faktora u reakciji građenja kompleksa. Standardni rastvor je korišćen u koncentraciji 0.002mg/ml, rastvor hidroksilamin hidrohlorida u opsegu koncentracija 10mg/ml - 30mg/ml, rastvor amonijum acetata u opsegu 30mg/ml - 90mg/ml i reagens 2,2'-dipiridin u koncentracijama 0.002mg/ml i 0.004mg/ml. Primenom  $2^3$  faktorskog dizajna ispitan je uticaj ovih faktora na odgovor sistema uzevši u obzir po dva nivoa ( najniži i najviši nivo koncentracija ). Procenjeni uticaj dat je u tabeli I. Slovom A je označen glavni uticaj koncentracije hidroksilamin hidrohlorida, slovom B glavni uticaj koncentracije amonijum acetata, slovom C glavni uticaj koncentracije 2,2'-dipiridina, slovima AB, AC, BC i ABC interakcije ovih faktora i slovom M opšta srednja vrednost svih uticaja.

**Tabela I** Procenjeni uticaji faktora na odgovor sistema

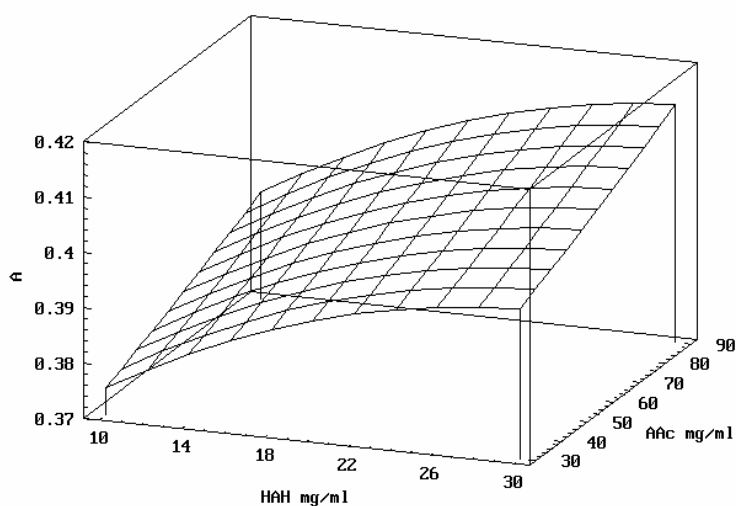
**Table I** Valuated influences of parameters on the system response

M	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
0.389	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$1.2 \cdot 10^{-2}$	$-5 \cdot 10^{-4}$	$-5 \cdot 10^{-3}$	$-4 \cdot 10^{-3}$	$8.5 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$

Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da na odgovor sistema (intenzitet apsorbcije nagrađenog kompleksa ) ne utiče promena koncentracije reagensa 2,2'-dipiridina koji je ovde radi obezbeđivanja kvantitativne reakcije dodat u velikom višku i njegov uticaj se na ovaj način ne može ispitivati. Uticaj ostalih reagenasa je ispitan i prema statističkoj proceni je značajan za građenje kompleksa. Primenjen je model polinoma drugog reda koji glasi:

$$A = 0.34339 + 0.00307X + 0.00017Y - 0.00005X^2 + \\ + 4,62963 \cdot 10^{-7} Y^2 - 1.25 \cdot 10^{-6} XY$$

Na osnovu dobijenih vrednosti parametara polinoma može se nacrtati odgovarajuća površina odgovora sistema u oblasti optimuma. Ona je prikazana na slici 1, pri čemu su na X-osi koncentracije hidroksilamin hidrohlorida, na Y-osi koncentracije amonijum acetata i na Z-osi apsorbcije rastvora nagrađenog kompleksa između  $Fe^{2+}$  i 2,2'-dipiridina.



**Slika 1. Površina odgovora sistema u oblasti optimuma**  
**Figure 1. Surface of system response in the optimal area**

Na osnovu površine odgovora sistema, može se zaključiti da vrednosti apsorpcije nastalog kompleksa rastu sa porastom koncentracija dodatih reagenasa i da se u jednom trenutku dostiže plato što znači da pri tim uslovima ovog uticaja više nema. Na taj način su odabrane koncentracije od 30mg/ml hidroksilamin hidrohlorida i 90mg/ml amonijum acetata kao optimalne pri ispitivanim uslovima za spektrofotometrijsku analizu feroglicin sulfata.

U toku određivanja feroglicin sulfata pomoću serije rastvora standardne supstance konstruisana je kalibraciona kriva i izračunati parametri na osnovu kojih se vidi da u posmatranom opsegu koncentracija važi Lambert-Beer-ov zakon.

**Tabela II** Parametri kalibracione krive

**Table II** Parameters of calibrational curve

<b>Opseg koncentracija ( µg/ml )</b>	<b><math>y = ax + b</math></b>	<b><math>r</math></b>	<b><math>Sb</math></b>	<b><math>Sa</math></b>	<b><math>tb</math></b>
0.2 – 4.0	$y=0.171x+0.071$	0.9998	0.0057	0.0232	1.356

$r$  - koeficijent korelacije;

$Sa$  - stand. dev. za nagib krive;

$Sb$  - stand. dev. za odsečak na ordinati;

$tb$  - dobijena vrednost studentovog  $t$  testa za testiranje značajnosti osečka na ordinati

Preciznost metode je dobra što je procenjeno izračunavanjem standardne devijacije i koeficijenta varijacije za pripremljene standardne rastvore.

**Tabela III** Rezultati procene preciznosti**Table III** Results of investigation of precision

Koncentracija standarada ( $\mu\text{g/ml}$ ) ( $n = 7$ )	Nađena koncentracija ( $X_s$ ) ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%)	S ( $\mu\text{g/ml}$ )	K (%)
1.0	0.973	97.3	0.020	2.05
2.0	1.961	97.9	0.028	1.43
3.0	2.946	98.1	0.039	1.32

S - standardna devijacija ;

K- koeficijent varijacije

Na osnovu 10 uzastopnih određivanja sadržaja ferglicin sulfata, dobijena je prosečna vrednost u ispitivanom uzorku *Orferon retard*<sup>®</sup> tableta predstavljena preko sadržaja  $\text{Fe}^{2+}$  jona.

**Tabela IV** Rezultati određivanja sadržaja ferglicin sulfata u uzorku**Table IV** Results of investigation of the level of ferglicin sulfat in the sample

Ispitivana koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ ) ( $n=10$ )	Izmerena Apsorbancija ( $A_i$ )	Nađena koncentracija ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%)	S ( $\mu\text{g/ml}$ )	K (%)
2.0	0.388	1.845	92.26	0.016	0.87

## ZAKLJUČAK

Primenom eksperimentalnog dizajna i metode površine odgovora postavljeni su optimalni eksperimentalni uslovi za VIS spektrofotometrijsko određivanje  $\text{Fe}^{2+}$  u *Orferon retard*<sup>®</sup> tabletama. Vrednosti statističkih parametara ukazuju na dobru preciznost

(ponovljivost) metode, a optimumi dobijeni primenom multiple regresione analize su realniji što doprinosi selektivnosti metode.

Statističkim planiranjem eksperimenta dobijena je racionalnija i ekonomičnija metoda za određivanje  $\text{Fe}^{2+}$  u ispitivanom uzorku. Dobijeni rezultati su precizni, pa se ovako unapređena metoda može preporučiti za rutinsku analizu doziranih oblika koji sadrže feroglicin sulfat.

## USING EXPERIMENTAL DESIGN IN OPTIMISATION OF VIS SPEKTROPHOTOMETRIC METHOD OF INVESTIGATION FEROGLICIN SULFATE IN *ORFERON RETARD*<sup>®</sup> TABLETS

M. ZEČEVIĆ<sup>\*</sup>, B. JOCIĆ, I. IVANOVIĆ<sup>\*</sup>

*Institute of pharmaceutical chemistry and drug analysis, Faculty of Pharmacy*

### Summary

Iron preparations are used in the treatment or prophylaxis of sideropenic anemia developed due to insufficiency of iron in the body. They can be used orally (tablets, capsules, suspensiones, wines ) and parenterally. The aim of this paper was to use experimental design to optimize a visible (VIS) spektrophotometric method for analysing feroglicin sulfate in tablet formulations. Traditional approach of step-by-step procedure is time consuming, requires a large number of experiments and optimises only one factor (experimental conditions) at the time, neglecting other factors as well as potential interaction. Using  $2^3$  faktor design, a set of planed experiments was performed, and factors that significantly influence the sensitivity of the method were detected and optimized. Optimal experimental conditions have been found and sensitivity and selectivity of the spectrophotometric method have been improved ( 1 ).

**Key words:** feroglicin sulfate, VIS spektrophotometric method, experimental design, optimisation



## **Literatura**

1. Zečević M. Primena matematičkih modela u HPLC analizama lekova. Zadužbina Andrejević, 1999:20.
2. Goodman. The pharmacological basic of therapeutics. 2001:1494-1502.
3. Martindale The Extra Pharmacopoeia. 33rd ed. 2003:1190-95.
4. European Pharmacopoeia 4th ed. 2002:705-10.